Tome 73, fascicule 2 (Hommage à Jakob Seiler), nº 12. — Mai 1966

Über eine Änderung musterbestimmender Qualitäten in einer Blastemkultur von *Drosophila melanogaster*

von

Ernst HADORN

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich *

mit 3 Textabbildungen

Meinem Lehrer und Freund Jakob Seiler zum 80. Geburtstag.

I. EINFÜHRUNG

In den Imaginalscheiben von verpuppungsreifen Drosophilalarven sind Anlagen für Organe und Körperteile der adulten Fliege mosaikartig vereinigt. Dabei lassen sich Areale oder „Feldbereiche" abgrenzen, deren Zellen je für eine spezifische Differenzierungsleistung determiniert sind (Hadorn u. Gloor, 1946; Hadorn, Bertani u. Gallera, 1949; Ursprung, 1959; Lüönd, 1961; Nöthiger, 1964). So enthält die männliche Genitalscheibe ein Blastemmosaik, in dem u.a. die folgenden Qualitäten festgelegt sind: Samenpumpe, Ductus ejaculatorius, Paragonien, Vasa efferentia, Penisapparat, Claspers, Analplatten und Enddarm.

Wir haben eine Technik ausgearbeitet, die es ermöglicht, die determinierten (aber noch nicht differenzierten) Zellverbände der larvalen Imaginalscheiben im Abdomen adulter Fliegen über Jahre hin in Dauerkultur zu halten und zu vermehren (Hadorn, 1963,

* Ausgeführt mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

1964, 1965*a*, 1965*b*). In diesem Medium geht die Zellteilung, die normalerweise zu Anfang der Metamorphose endgültig eingestellt wird, beliebig lange weiter, ohne dass dabei je eine Adultdifferenzierung einsetzen würde. Gleichzeitig bleibt aber die Kompetenz zu dieser Differenzierung in der Mehrzahl der Kulturen dauernd erhalten. Werden nämlich Proben aus unseren Zell-Linien in larvale Wirte zurückversetzt, mit denen sie die Metamorphose passieren können, so differenzieren sich solche „Teststücke“ zu Adultstrukturen.

Das hier nur skizzierte Verfahren der Dauerkultur *in vivo* kann darüber Aufschluss geben, ob und wie lange ein bestimmter Determinationszustand durch Zellvermehrung unverändert repliziert wird.

Wie ich in den eben zitierten Arbeiten mitgeteilt habe, wurden in den Teststücken folgende Kategorien von Differenzierungsleistungen festgestellt:

1. Autotypische Differenzierungen: Sie entsprechen der ursprünglichen prospektiven Bedeutung der isolierten und kultivierten Blasteme. So werden z.B. Determinationsqualitäten für Claspers, Analplatten und Enddarm in Kulturen, die mit Material aus männlichen Genitalscheiben begründet wurden, durch „Zellvererbung“ dauernd und unverändert weitergegeben.

2. Allotypische Differenzierungen: Ein Vorgang, der als „Transdetermination“ bezeichnet wird (Hadorn, 1965*b*) führt dazu, dass der ursprüngliche Determinationszustand in eine neue Richtung umschlägt. So geht eine mit Genitalblastemen angesetzte Kultur zur Bildung von Blastemen über, die sich nun zu Antennen, Beinen, Flügeln oder Thoraxteilen differenzieren.

3. Normotypische Differenzierungen: Das Differenzierungsmuster entspricht einer Normalleistung, gleichgültig, ob es sich dabei um eine auto- oder allotypische Bildung handelt.

4. Anormotypische Differenzierungen: In einzelnen Subkulturen können Determinationszustände stabilisiert und weiter vererbt werden, die zu aberranten Differenzierungsmustern führen, wie sie auf dem normalen Fliegenkörper nirgends anzutreffen sind.

5. Telotypische Differenzierungen: Darunter verstehen wir Leistungen von Testimplantaten, die einer Vollmetamorphose entsprechen.

6. Atelotypische Differenzierungen: Einzelne Subkulturen verlieren mehr oder weniger weitgehend die Fähigkeit zur imaginalen Differenzierung. Sie erreichen im metamorphosierenden Wirt das adulte Endstadium nicht mehr.

In der vorliegenden Mitteilung wird eine anormotypische Differenzierung vorgestellt.

II. BEFUNDE

1. Allgemeine Charakteristik der Subkultur

Die Kultur, über die ich hier berichte, wurde im Oktober 1962 mit der Sagittalhälfte einer männlichen Genitalscheibe begründet (vergl. Abb.: 1 Hadorn, 1964). Im Verlaufe von drei Jahren konnten von dieser Stammlinie (Nr. 12) zahlreiche Subkulturen abgezweigt werden. Über ihre Differenzierungsleistungen geben uns 1845 Testimplantate Auskunft. In der vorliegenden Mitteilung berücksichtigte ich jedoch nur eine Subkultur. Eine summarische Übersicht über ihre Differenzierungen ist in Abb. 1 dargestellt. Unter n wird die Zahl der Testimplantate einer Transfergeneration (Trg) angegeben. Bis zu Trg 17 blieb die Proliferationsrate im Adultwirt relativ gering. So konnten nur wenige Testimplantate abgezweigt und zur Metamorphose gebracht werden. Da zudem einzelne mit Implantaten beschickte Wirtslarven starben, lieferten verschiedene Trg keine Information (z.B. 4,7). Mit Trg 16 setzte in der Kultur eine sehr ausgiebige Proliferation ein. Daher konnten z.B. in der 18. Trg 33 Testimplantate gewonnen werden. Von diesem Zeitpunkt an wurde stets nur noch ein kleiner Teil des verfügbaren Materials für Testimplantate verwendet. Bis zu Trg 48 wurde lückenlos getestet. Später, so namentlich im Jahre 1965, habe ich darauf verzichtet, die Differenzierungsleistungen einer jeden Transfergeneration zu prüfen. Leider ist die Subkultur im Oktober 1965 nach Trg 80 infolge einer Infektion ausgestorben.

Wie Abb. 1 zeigt, wurden von den Teststücken bis zu Trg 6 alle erwarteten Strukturen des Geschlechtsapparates, sowie auch Anal-

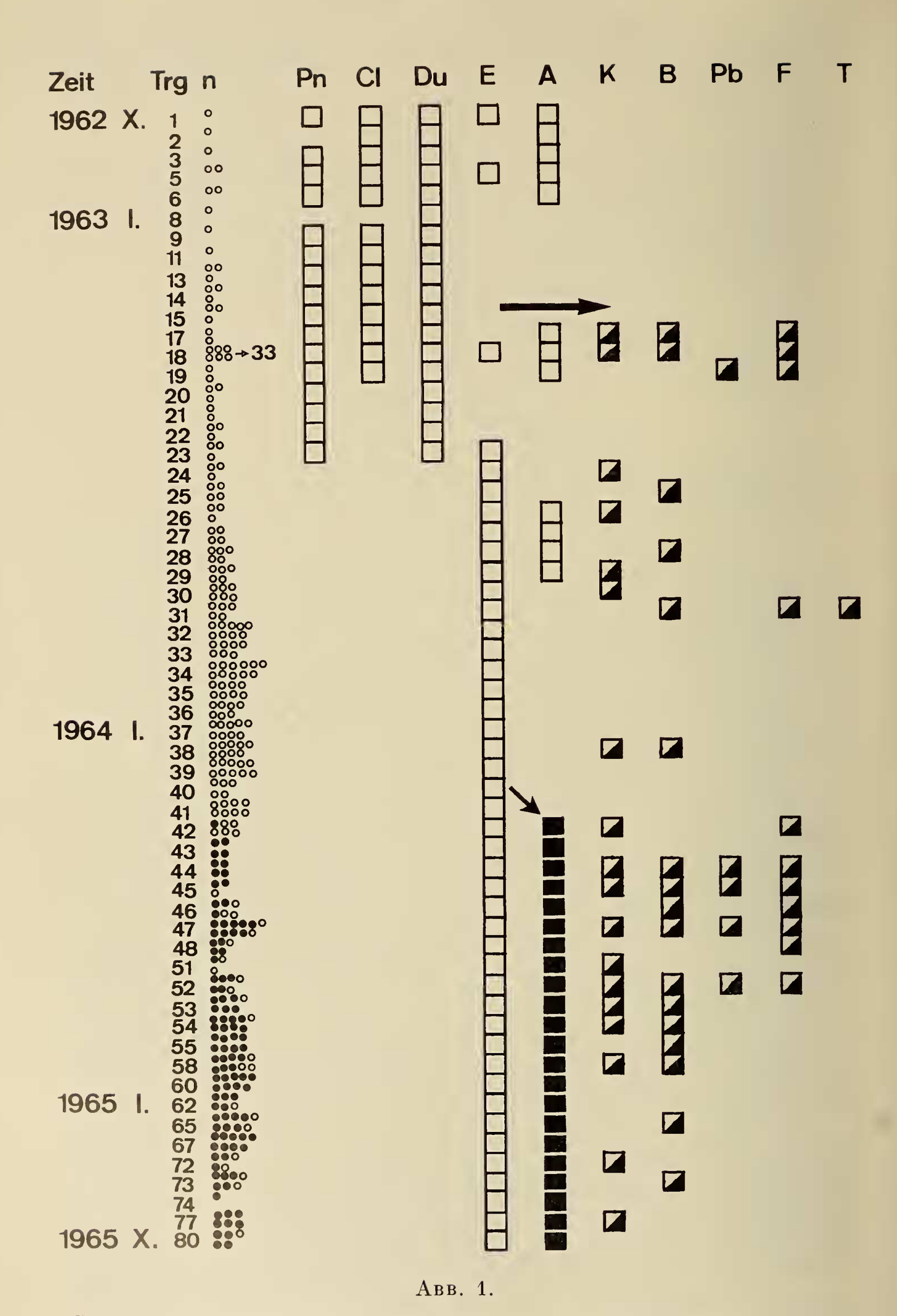


ABB. 1.

„Stammbaum" der Differenzierungen im Verlaufe der Transfergenerationen (Trg) 1-80; n: Anzahl der metamorphosierten Testimplantate. Pn: Penisapparat; Cl: Claspers; Du: Ductus ejaculatorius; E: Enddarm und Epithelien; A: Analplatten; K: Kopfstrukturen mit Antennen; B: Beinteile; Pb: Palpus; F: Flügel; T: Thorax. Leere Quadrate: autotypische Differenzierungen; schräg gefüllte Quadrate: allotypische Differenzierungen; schwarze Blöcke und schwarze Kreise (unter n): anormotypische Analplatten.

platten und Enddarm gebildet. Es sind dies autotypische Differenzierungen. Sie gehen aus den determinierten Blastemen hervor, die im Ausgangsmaterial vertreten sind. In den Trg 8-15 fehlen dann Analplatten (A) und Enddarm (E). Sehr wahrscheinlich wurden Blasteme, die diese Determinationsqualitäten tragen, nur zufällig den zur Weiterzucht eingesetzten „Stammstücken" nicht mehr zugeteilt. Mit Trg 17 erscheinen A und E wieder. Auf Grund unserer Erfahrungen mit anderen Subkulturen ist anzunehmen, dass diese Blasteme erneut aus Ductusprimordien (Du) hervorgegangen sind. Mit Trg 23 verschwinden die Differenzierungspotenzen für die Elemente des eigentlichen Geschlechtsapparates (Penis: Pn; Clasper: Cl; Ductus: Du) endgültig. Da in zahlreichen anderen Subkulturen diese Determinationsqualitäten dauernd weiter kultiviert und vermehrt werden konnten, wird der Ausfall in der in Abb. 1 dargestellten Linie als ein operativ und lediglich zufällig bedingter Zuteilungsverlust gedeutet.

Ab Trg 17 wurden erstmals allotypische Differenzierungen festgestellt (Kopf: K; Bein: B; Flügel: F). Ihr Auftreten beruht auf Transdetermination. Dabei ist nach den Erfahrungen an anderen Subkulturen (Hadorn, 1965*b*) anzunehmen, dass die Umstellung in prolifierierenden Zellpopulationen erfolgte, die dem Analplattenblastem entstammen (Pfeil). In der vorliegenden Subkultur erscheinen die allotypischen Strukturen sporadisch und in relativ geringer Frequenz immer wieder bis zur Trg 77. Im Gegensatz zu diesem Verhalten waren bei zahlreichen anderen Linien nach erfolgter Transdetermination in allen Testimplantaten allotypische Differenzierungen nachzuweisen. Da überdies auch Linien abgezweigt werden konnten, die nur noch allotypische Differenzierungen liefern, wissen wir, dass transdeterminierte Blasteme ihre neu erworbenen Qualitäten durch Zellheredität an ihre Nachkommen weiter vererben. Andererseits können sich Transdeterminationsvorgänge in einer Dauerkultur vielfach wiederholen. So wäre etwa in unserem Beispiel für Kopf (K) und Bein (B) in Trg 38 eine erneute Transdetermination aus E (Enddarm oder Epithelien) zu postulieren, während das Vorkommen von Flügel (F) in den Trg 42-52 auf nur einem Transdeterminationsvorgang beruht. Anschliessend wird die Flügelqualität durch Zellheredität weiter vermehrt.

Soweit zeigen die Differenzierungsleistungen unserer Subkultur nichts, was nicht in vielen anderen Linien auch festgestellt wurde.

Einmalig ist dagegen ein neuer aberranter Differenzierungstyp, der sich nach 18 Monaten Kulturdauer in der Trg 42 einstellte. Diese anormotypische Struktur soll weiter unten beschrieben und interpretiert werden. Vorher aber haben wir noch die Normalleistungen von kultivierten Analplattenblastemen zu erläutern.

2. Die normotypischen Analplatten

In situ umgeben die beiden Analplatten den Anus (Abb. 2*a*). Sie tragen je durchschnittlich 35 schlanke Borsten, die in einem charakteristischen Muster angeordnet sind. Am Vorderende der Platten stehen die Borsten dicht gedrängt, gegen hinten sind sie

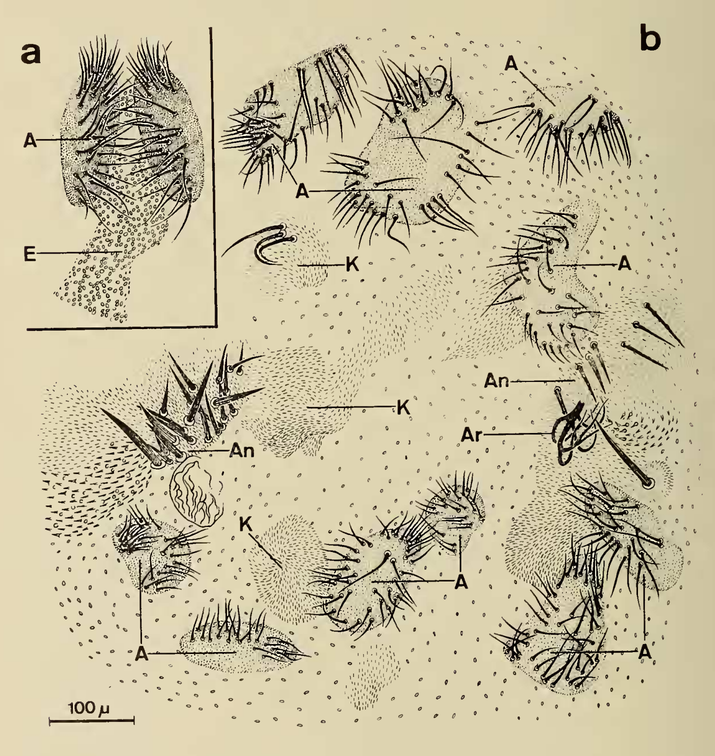


Abb. 2.

a. Analplatten (A) und Enddarm (E) in situ. b. normotypisch arealisierte Analplatten (A) aus einem Testimplantat, sowie allotypische Antennen (An), Arista (Ar) und weitere Kopfstrukturen (K).

in grösseren Abständen lockerer angeordnet und auch etwas länger als vorn.

Mit unserer Technik geben wir den Analplattenblastemen Gelegenheit, sich durch andauernde Zellteilung zu vergrössern. Eine solche Proliferation kann, wie zahlreiche Linien zeigen, über viele Transfergenerationen hin während Jahren weitergehen. Falls dabei der ursprüngliche Determinationszustand repliziert wird, müssen überdimensionierte Blasteme enstehen. Wir fragen nun: Werden in Testimplantaten, die wir solchen Kulturen entnehmen, auch überdimensionierte Analplatten gebildet, die nun mehrere hundert Borsten tragen? Die Antwort gibt der in Abb. 2b dargestellte Ausschnitt aus einem Testimplantat. Wir stellen hier 10 klar abgegrenzte Analplatten (A) fest, die annähernd normal dimensioniert sind. Dabei wird auch das ursprüngliche Anordnungsmuster der Borsten mehr oder weniger getreu wiederholt. Eine noch exaktere Kopie des Normalmusters darf kaum erwartet werden, weil in einer Zellkultur die ursprüngliche topographische Anordnung der Blasteme verändert wird. So sind die beobachteten Abweichungen als „Topomorphosen" zu deuten, die auch bei einem unveränderten Determinationszustand zu erwarten sind.

Der in Abb. 2*b* vertretene Differenzierungstyp ist charakteristisch für mehr als 40 Subkulturen, in denen die autotypische Analplattenqualität während zahlreicher Trg weiter gegeben wurde. Überall wurden normotypisch gemusterte und annähernd normal dimensionierte Einzelplatten abgegliedert. Wir bezeichnen dieses Verhalten als „homonome Arealisation" (Hadorn, 1964; Gehring, 1966). In besonders grossen Testimplantaten konnten bis zu 20 arealisierte Analplatten festgestellt werden. In unserer in Abb. 1 dargestellten Subkultur wurden normotypische Analplatten, wie sie in Abb. 2*b* zu sehen sind, von Trg 1-29 gebildet. Dabei wird mit 9 Platten in einem der 33 Testimplantate der Trg 18 das Maximum erreicht. Das Implantat der Abb. 2*b* stammt aus der Trg 10 einer Parallellinie. Ich habe es lediglich deshalb als Bildvorlage verwendet, weil hier im metamorphosierten Präparat die einzelnen Platten für eine zeichnerische Darstellung besonders günstig verteilt sind. Im übrigen zeigt Abb. 2*b* neben den autotypischen Analplatten auch einzelne allotypische Differenzierungen, wie Teile von Antennen (An) mit Arista (Ar) sowie Partien der chitinisierten Kopfkapsel (K), die ein feines Trichommuster (Härchen) tragen.

3. Die anormotypischen „Analplatten“

Mit Trg 29 verschwinden in unserer Subkultur (Abb. 1) die normotypisch arealisierten Analplatten endgültig. In den Testimplantaten werden, abgesehen von einigen allotypischen Differenzierungen, bis zur Trg 41 nur noch Enddarmgewebe sowie Epithelien gebildet, die keine Cuticularstrukturen mehr liefern.

Zu unserer Überraschung erschien in Trg 42 in einem der vier Testimplantate (ausgefüllter Kreis in Abb. 1) eine Differenzierung, die als anormotypische Analplattenstruktur zu klassifizieren ist. Dieser neue Typ wurde anschliessend ohne Unterbruch von jeder Trg bis zum Aussterben der Subkultur geliefert. Wir haben solche



Abb. 3.

Nicht arealisierte anormotypische Analplattendifferenzierung aus Trg 48, umgeben von Enddarm und Epithelien.

aberrante Analplatten in total 111 Testimplantaten festgestellt (Abb. 1). Ein repräsentativer Einzelfall aus Trg 45 ist in Abb. 3 wiedergegeben. Auf einer umfangreichen Cuticularplatte stehen mehrere hundert Borsten, alle von gleicher Länge. Sie sind insofern „homogen“ verteilt, als überall gleich grosse Abstände eingehalten werden. Kleine Abweichungen von dieser „Äquidistanzordnung“ beruhen darauf, dass im Präparat die Cuticula da und dort etwas gedehnt oder gestaucht ist.

Mit welchem Recht dürften wir die neue Differenzierung als anormotypische Analplatte ansprechen?

a) Wie der Stammbaum zeigt (Abb. 1, schräger Pfeil), handelt es sich um eine Zellpopulation, die aus dem „E“-Blastem hervorgegangen ist. Dabei wissen wir allerdings nicht, ob die anormotypischen Platten von Enddarmzellen abzuleiten sind oder ob sie von Epidermisepithelien abstammen, die vielleicht die Analplattendetermination direkt weitergeben. Wie bereits oben erwähnt wurde, hätten solche Zellen vorübergehend die Fähigkeit verloren, eine borstentragende Cuticula zu differenzieren. Erfahrungen mit anderen Sublinien stützen aber die erste Deutung, weil feststeht, dass Determinationsqualitäten für normotypische Analplatten und Enddarm als untrennbare Partner stets zusammen weiter vererbt wurden. Tatsächlich sind auch die anormotypischen Platten der Trg 42-80 in allen Testimplantaten von Enddarmzellen begleitet und umgeben (vergl. Abb. 3). Sie verhalten sich somit wie normotypische Analplatten.

b) Die Borsten der aberranten Platten sind nicht gestreift, und die Cuticularfläche, die zwischen den Borsten steht, trägt keine Trichome (Haare). Diese beiden Merkmale sind charakteristisch für Borstenorgane, die aus der Genitalscheibe hervorgehen. Auf dem übrigen Fliegenkörper finden wir fast ausnahmslos nur gestreifte Borsten (Abb. 2*b*; An).

c) Nun bleibt nur noch die Wahl zwischen Analplatten und den übrigen Borstengruppen, die von Blastemen der Genitalscheibe gebildet wurden. In Frage kommen die Lateralplatten oder auch Teile des Genitalbogens. Doch sind diese Alternativen aus verschiedenen Gründen auszuschliessen. Abgesehen von morphologischen Kriterien, die einer solchen Zuordnung widersprechen,

werden die Lateralplatten- oder Genitalbogenblasteme in Dauerkulturen nicht wie die Analplattenanlagen von Enddarmzellen begleitet.

Zusammenfassend können wir mit Sicherheit die aberranten Platten als anormotypisch modifizierte Analplatten auffassen. Wie aber unterscheiden sie sich von normotypischen Analplatten?

a) Die Fähigkeit zur homonomen Arealisation ging verloren. Anstelle von individualisierten Platten entstehen grosse zusammenhängende Komplexe.

b) Das charakteristische Verteilungsmuster wird nicht mehr realisiert. Es kann daher nicht mehr unterschieden werden zwischen Arealen mit gedrängter Borstenanordnung und Bereichen mit lockerer Verteilung der Einzelborsten. Ein neues, ein Äquidistanzmuster, kommt zur Differenzierung.

c) Die Borsten selbst sind im Vergleich zur Analplattennorm verkürzt, basal verdickt und daher schärfer zugespitzt. Ausserdem sind alle gleich lang.

III. DISKUSSION

Auf das Phänomen der „Transdetermination" möchte ich in dieser Mitteilung nicht näher eingehen. Wie anderswo erläutert wurde (Hadorn, 1965*b*), handelt es sich dabei wahrscheinlich um einen Vorgang, der sich (bei unveränderter Erbsubstanz) auf dem Niveau der Genmanifestation oder der kontrollierten Genaktivität abspielt. Dagegen soll kurz versucht werden, das Auftreten der anormotypischen Analplatten zu interpretieren.

Zunächst ist hervorzuheben, dass hier ein seltenes Ereignis vorliegt, das unter mehr als 50 Subkulturen nur einmal beobachtet wurde. Dabei wurde ein neuer Zelltyp inauguriert, der unverändert weiter vererbt wird. Beides ist vereinbar mit der Annahme, dass in unserer Subkultur eine somatische Mutation aufgetreten ist. Die Zellen des mutierten „Klons" müssten dann allerdings über eine genügende Vitalität und Vermehrungsaktivität verfügen. Direkt nachweisen lässt sich ein solcher Mutationsvorgang nicht. Doch kann ich auf ebenfalls einmalige Änderungen hinweisen, die

in anderen Subkulturen auch zu anormotypischen Blastemen führten. So wurde über eine Linie berichtet, in der die Bildungspotenz für alle Borstenorgane zum Ausfall gekommen ist (HADORN, 1965*a*). In dieser borstenlosen Kultur werden nur noch die Trichome des Grundmusters gebildet.

Gemeinsam ist solchen „mutationsartigen“ Typen, dass musterbildende Potenzen und Qualitäten betroffen sind. So gewinnen wir neue Informationen über Eigenschaften von Blastemen, selbst dann, wenn die „Mutationsfrage“ offen bleibt.

Zellen, die für normotypische Analplatten determiniert sind, verfügen über ein Informationssystem, das sich in dreifacher Hinsicht auswirkt. Erstens ist eine charakteristische Borstenform und Borstengrösse bestimmt; dies sind Manifestationsmerkmale von Einzelzellen. Zweitens ist ein „überzelliges“ Prinzip wirksam, das die einzelnen Borstenorgane musterartig anordnet, und drittens verfügen die Zellen der Analplattenblasteme über einen „Masstab“, der die Grösse einer Platte festlegt. So kommt es zur homonomen Arealisation. Dieses Informationssystem kann unverändert über beliebig viele Zellgenerationen hin weiter vererbt werden.

Die soeben formulierten Aussagen haben wir den Beobachtungen zu verdanken, die an den anormotypischen Analplatten gemacht werden konnten. Als Folge eines wohl einmaligen Ereignisses wurde hier das normotypische Informationssystem irreversibel geändert. Dabei erscheint nicht nur ein neuer Differenzierungstyp in der borstenbildenden Einzelzelle, sondern gleichzeitig geht auch das ursprüngliche Verteilungsmuster der für Borsten determinierten Zellen verloren, und schliesslich wird noch die Kontrolle über die Organgrösse aufgegeben.

Damit ist wohl gezeigt, dass die drei Differenzierungsqualitäten auf einer gemeinsamen genetischen oder zellphysiologischen Grundlage beruhen, die als zellhereditäre Information und Einheit repliziert wird.

SUMMARY

1. This paper characterizes the various types of differentiation which were obtained from a cell line originally derived from a male genital disc. This line was maintained in the abdomens of adult flies for a three year period.

2. Special attention is given to the occurrence of anormotypic analplates which appeared suddenly in the 42nd transfer generation after 18 months of proliferation *in vivo*.

3. In this «mutated» line the following aberrant characters are propagated by cell heredity:

   (a) Change in form and size of the bristles.

   (b) Change in distribution of the bristles. Instead of the normal pattern all bristles in the anormotypic analplates are arranged at the same mutual distance.

   (c) Loss of the capacity for arealisation. Huge nondivided complexes are formed instead of normal sized and individualized plates.

4. Conclusions are drawn concerning cell inherited systems of information which are pertinent for differentiation and pattern formation.

RÉSUMÉ

1. Des cellules d'un disque génital mâle ont été maintenues en culture *in vivo* dans l'abdomen de mouches adultes pendant 3 ans. Nous avons étudié les différenciations cellulaires obtenues au cours de ces trois années.

2. Nous nous sommes intéressés en particulier aux plaques anales anormotypiques, qui sont apparues soudainement dans la 42e génération de transfert après 18 mois de culture *in vivo*.

3. Dans cette lignée cellulaire mutée, les caractères suivants sont transmis par hérédité cellulaire:

   a) Changement de forme et de dimension des soies.

   b) Changement dans la distribution des soies, qui, dans les plaques anales anormotypiques sont placées à la même distance les unes des autres.

   c) Perte de la capacité « d'aréalisation », entraînant la formation de complexes géants au lieu des plaques anales bien individualisées et de dimensions normales.

4. Nous tirons enfin des conclusions concernant des systèmes d'information transmis par hérédité cellulaire qui contrôlent des processus de différenciation et la réalisation des «pattern».

LITERATURVERZEICHNIS

GEHRING, W. 1966. *Übertragung und Änderung der Determinationsqualitäten in Antennenscheiben-Kulturen von Drosophila melanogaster.* J. Embryol. exp. Morph. 15, Part 1, 77-111.

HADORN, E. 1963. *Differenzierungsleistungen wiederholt fragmentierter Teilstücke männlicher Genitalscheiben von Drosophila melanogaster nach Kultur in vivo.* Develop. Biol. 7: 617-629.

— 1964. *Bedeutungseigene und bedeutungsfremde Entwicklungsleistungen proliferierender Primordien von Drosophila nach Dauerkultur in vivo.* Rev. suisse Zool. 71: 99-115.

— 1965*a*. *Ausfall der Potenz zur Borstenbildung als „Erbmerkmal" einer Zellkultur von Drosophila melanogaster.* Z. Naturf. 20*b*, 290-292.

— 1965*b*. *Problems of determination and transdetermination. Brookhaven Symposia in Biol.* 18: 148-161.

HADORN, E., BERTANI, G. u. GALLERA, J. 1949. *Regulationsfähigkeit und Feldorganisation der männlichen Genital-Imaginalscheibe von Drosophila melanogaster.* Roux' Arch. 144: 31-70.

HADORN, E. u. GLOOR, H. 1946. *Transplantationen zur Bestimmung des Anlagemusters in der weiblichen Genital-Imaginalscheibe von Drosophila.* Rev. suisse Zool. 53: 495-501.

LÜÖND, H. 1961. *Untersuchungen zur Mustergliederung in fragmentierten Primordien des männlichen Geschlechtsapparates von Drosophila séguyi.* Develop. Biol. 3: 615-656.

NÖTHIGER, R. 1964. *Differenzierungsleistungen in Kombinaten, hergestellt aus Imaginalscheiben verschiedener Arten, Geschlechter und Körpersegmente von Drosophila.* Roux' Archiv 155: 269-301.

URSPRUNG, H. 1959. *Fragmentierungs- und Bestrahlungsversuche zur Bestimmung von Determinationszustand und Anlageplan der Genitalscheiben von Drosophila melanogaster.* Roux' Archiv 151: 504-558.

